

葡聚糖多克隆抗体制备与纯化

曾练强¹,王生育²,李雨虹¹,颜江华²,黄霄红²,梁达奉^{1,3}

(1.广州甘蔗糖业研究所/广东省甘蔗改良与生物炼制重点实验室,广东 广州 510316 2.厦门大学医学院,福建 厦门 361005 3.广东工业大学轻工化工学院,广东 广州 510009)

【摘 要】以 Dextran T40 和 BSA 的交联物为抗原,多次免疫新西兰白兔,收集血清,并用 rProtein A 亲和层析柱纯化抗体,成功获得较高纯度的兔抗葡聚糖多克隆抗体。用 ELISA 法测定其效价,抗体效价为 1:32000 以上。

【关键词】葡聚糖;免疫;多克隆抗体;亲和层析柱纯化

【中图分类号】TS201

【文献标识码】A

【文章编号】1003-2673(2009)11-04-02

1 前言

葡聚糖的存在给制糖工艺过程从蔗汁澄清到糖的精炼带来不良影响,如粘度增大,过滤困难,增加能耗,糖分测定时存在旋光度虚假增高的现象等,同时葡聚糖含量过高的糖产品在适用性上受到限制,且售价也会降低。

为消除葡聚糖在制糖工业的不良影响,定量检测其含量非常重要。但葡聚糖的快速准确定量检测目前还是一个难题。免疫学检测法是一个很有希望的方向,它不要求从样品中预分离葡聚糖,具有简便、准确、灵敏度高等优点,适合于制糖工艺任一工序中葡聚糖含量的测定。目前国外已有部分糖厂采用免疫法进行生产检测^[1],但由于所需要的抗体相当昂贵,在国内的糖厂还没有被使用的报道。

为建立葡聚糖的免疫学检测方法,本研究用 Dextran T40 和 BSA 的交联物免疫新西兰白兔获得多克隆抗体,纯化并检测其效价^[2]。

2 材料与方法

2.1 供试材料

Dextran T40、T2000 为 Pharmacia 公司产品。rProtein A 为 SepharoseTM 分装产品。完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂、OPD、BSA、OVA、Goat anti-rabbit IgG-HRP 购自 SIGMA 公司。其它试剂为国产试剂。

2.2 葡聚糖多抗的制备

2.2.1 Dextran T40 和 BSA、OVA 交联物的制备

按合适比例将 BSA 与 Dextran 40 混合,用水溶解调至 6% (W/V)冷冻干燥。研磨成粉末状后放置 60℃下恒温,保持相对湿度 79%,并在容器底部放置饱和的 KBr 溶液,时间 0~7d^[3]。每天取样进行 SDS-PAGE 电泳,过碘酸-Schiff 试剂法染色^[4]和考马斯亮蓝 R250 染色鉴定。得到 Dextran T40-BSA 交联物。用同样的方法制备 Dextran T40-OVA。

2.2.2 葡聚糖多抗的制备

将 Dextran T40-BSA 交联物与等量完全福氏佐剂混合并充分乳化,经背部皮内多点注射成年雄性新西兰白兔,每次抗原剂量为 1000μg/只。2 周后以等量不完全福氏佐剂进行第 2 次免疫,之后每隔 2 周加强免疫 1 次,3 次免疫后采血测定血清

中抗体的效价。采血前 3d,耳静脉加强免疫,剂量为 500μg/只。颈动脉插管放血,分离血清,置 -20℃保存。

2.3 葡聚糖多抗的纯化

用 Buffer A (0.05M Boric acid, 4.0M NaCl, pH9.0) 平衡 rProtein A 亲和层析柱,加少量的血清,用 Buffer B (0.05M Sodium phosphate, 0.05M Sodium citrate, 0.3M NaCl, pH3.0) 洗脱,收集蛋白进行效价测定。

2.4 兔抗 Dextran T40 抗体的效价测定

采用间接 ELISA 法^[5]。将 Dextran T40-OVA 交联物用包被缓冲液稀释,包被于 96 孔板,100μl/孔,4℃过夜。用封闭液 (10%正常人血清) 封闭 2h,每孔加入不同稀释度的血清 100μl。同时设立阳性、阴性对照,37℃放置 1h,用 PBST 洗涤液洗 3 次后,加羊抗兔酶标二抗,37℃放置 1h,再用 PBST 洗 3 次,加入 OPD 底物溶液,37℃避光放置 15min,加终止液 (2M H₂SO₄ 溶液) 终止反应,OD490 读取结果。

3 结果与分析

3.1 Dextran T40-BSA 交联物的制备

在 0-7d 的制备过程中,取样进行 SDS-PAGE 电泳,糖染色和考马斯亮蓝 R250 染色,结果如图 1 所示,可见,反应 1d 后,BSA 大量减少,交联物大量出现,条带非常明显。随着反应时间的增加,条带越来越深,说明共价结合反应不断发生,聚合程度不断增加,分子量越来越大,得到大量的交联物。而干热反应 0d 时,未见交联物条带。

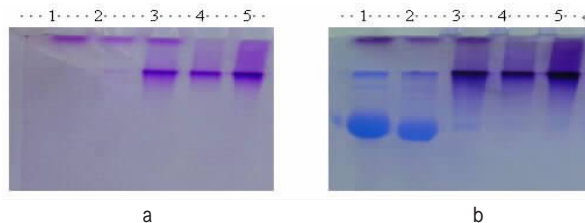


图 1 Dextran 40-BSA 干热反应 SDS-PAGE

a. glucogenm stain; b. coomassie stain.

1, BSA; 2, Dextran T40-BSA conjugate reaction for 0d; 3, Dextran T40-BSA conjugate reaction for 1d; 4, Dextran T40-BSA conjugate reaction for 3d; 5, Dextran T40-BSA conjugate reaction for 7d.

【作者简介】曾练强,男,高级工程师,从事化学、微生物学等方面的研究。

3.2 葡聚糖多抗的制备

将上述反应 7 天后的 Dextran T40- BSA 交联物与等量完全福氏佐剂混合并充分乳化,经背部皮内多点注射成年雄性新西兰白兔,每次抗原剂量为 1000μ g/ 只。2 周后以等量不完全福氏佐剂进行第 2 次免疫,之后每隔 2 周加强免疫 1 次。经 4 次免疫后采血,采血前 3d,耳静脉加强免疫 1 次,剂量为 500μ g/ 只。颈动脉插管采血,分离血清,即得到葡聚糖多抗血清,置 - 20℃ 保存。

3.3 血清效价测定

制备的葡聚糖多抗血清用 ELISA 法测定血清效价,以 OD 值 P≥ 1.0 的血清稀释度作为血清效价,因阴性对照的 OD 值 N 为 0.051,此时 P/N=20,远远大于经验值 2.1,可判断抗体为阳性。由图 2 可见,血清抗体效价达 1 : 32000 以上。

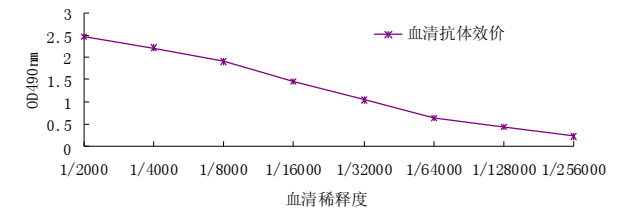


图 2 血清抗体效价测定

3.4 抗体的纯化

血清经 rProtein A 纯化,收集各流出液进行 SDS- PAGE 电泳。经 rProtein A 纯化后,在分子量为 55kD 和 22kD 处呈现两条带,分别相当于抗体的重链和轻链的分子量,证明血清经纯化可获得纯度较高的抗体,结果见图 3。

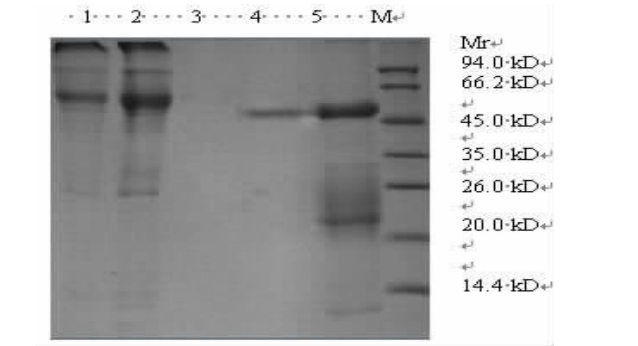


图 3 兔 IgG 纯化 SDS- PAGE

1, serum; 2, effluent liquid of serum through column; 3-5, the 1st, 2nd, 3rd of elution serum.

4 讨论

多抗制备的关键是免疫抗原的合成, Maillard 反应干热交联法虽然制备周期长,但是产量高、纯度好,而且能较好保持葡聚糖的化学结构,有利于白兔对葡聚糖的免疫应激反应,产生葡聚糖抗体,故采用 Maillard 反应干热交联法。

目前抗体分离方法很多,主要有硫酸铵沉淀法,辛酸沉淀法, DEAE 离子交换层析法, 羟基磷灰石层析法, 凝胶层析法, 以及上述方法相结合的联合分离方法。同时还有 Protein A 亲和层析法, Protein G 亲和层析法, 抗原亲和层析法和抗抗体亲和层析法, 在这些方法中, 郭刚^[6]认为, rProtein A 是分离、纯化兔抗体的较好的方法之一。为了得到高效价、高纯度的抗体, 我们采用 Protein A 纯化兔血清 IgG。

本实验通过 Maillard 反应干热交联法成功制备了免疫原及检测原, 通过免疫新西兰白兔, 间接 ELISA 方法测定抗体滴度, 常规方法分离血清, 得到较高纯度的葡聚糖多抗。

参考文献

[1]D. F. Day, J. Cuddihy and J. Rauh 。 Versatility of the Antibody Dextran Test Method, Journal American Society of Sugarcane Technologists, Vol. 23, 2003.
[2]戚 荣,梁达奉,陈海宁等.抗葡聚糖单克隆抗体制备研究[J].甘蔗糖业, 2006,(3):40 - 42.
[3]Akio Kato ,Youko Sasaki ,Ritsuko Furuta ,et al 。 Functional protein - polysaccharide conjugate prepared by controlled dry - heating of ovalbumin - dextran mixtures [J] . Agric Biol Chem,1990 ,54 (1) : 107 - 112.
[4]曹佐武.糖蛋白 PAGE 分离后的糖基显色法[J].生物技术通报,2006, (5):87 - 89.
[5]邵敏,李明,潘小玫等.多克隆抗体制备、鉴定与应用[J].中国农业科学, 2005,38(8):1570 - 1573.